УДК 594.381 + 591.113.1

РЕАКЦИЯ ГЕМОЦИТОВ МОЛЛЮСКОВ PLANORBARIUS CORNEUS НА КСЕНОТРАНСПЛАНТАТ

© Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев*

РГПУ им. А. И. Герцена, кафедра зоологии,
Лаборатория экспериментальной зоологии
наб. р. Мойки, 48, С.-Петербург, 191186
* E-mail: ataev@herzen.spb.ru

Поступила 30.01.2015

Изучена тканевая реакция моллюсков *Planorbarius corneus* на введение ксенотрансплантата (вибрисса кошки). Трансплантат вводился в ткани моллюска с помощью инъекционной иглы. Через сутки после введения трансплантата на его поверхности наблюдается распластывание гемоцитов. Раневой канал, оставшийся после введения иглы, купируется гемоцитарной капсулой со стороны тканей моллюска, стенка которой состоит из 5—15 слоев уплощенных клеток. Также наблюдается процесс заполнения гемоцитами полости раневого канала и сердцевины вибриссы. При инкубации вибриссы *in vitro* наблюдается налипание и оседание гемоцитов на ее поверхности.

Ключевые слова: моллюски, *Planorbarius corneus*, ксенотрансплантат, гемоциты, инкапсуляция.

Актуальность изучения иммунных реакций моллюсков (прежде всего гастропод) во многом обусловлена их ролью промежуточных хозяев трематод. Исторически первые сведения о защитных реакциях моллюсков получены именно при изучении развития партенит. Позднее для раскрытия механизмов этих реакций стали широко применяться стандартные иммунологические подходы с использованием методов иммунизации с введением в моллюсков бактерий, фрагментов тканей различных животных, искусственных имплантатов и др.

При этом долгое время основным объектом исследования были клеточные защитные реакции моллюсков (Атаев, Полевщиков, 2004). Однако последние десятилетия основные усилия направлены на изучение гуморальных аспектов их иммунного ответа, хотя в области клеточных реакций осталось много дискуссионных вопросов. Одним из них является специфичность реакции моллюсков на ауто-, алло- и ксенотрансплантаты.

Для изучения трансплантационного иммунитета легочных моллюсков обычно использовались различные фрагменты тканей от объектов, находящихся с реципиентом в различной степени родства (Ratcliffe et al., 1985;

Jourdane, Cheng, 1987; Sullivan, 1990, и др.). Основное противоречие между авторами заключается в признании одними и отрицании другими способности гемоцитов распознавать аллотрансплантаты. Есть работы с помещением в моллюска имплантатов из искусственного материала (Крюкова и др., 2008). В данном случае заметной клеточной реакции (инкапсуляции) на трансплантат не выявлено. В нашем исследовании в качестве ксенотрансплантата был использованы вибриссы кошки.

Объектом исследования стали моллюски *Planorbarius corneus* лабораторной линии. Несмотря на то что этот вид широко распространен и является хозяином многочисленных видов трематод, сведений о его клеточном ответе на чужеродные факторы очень мало. Лучше изучен клеточный состав гемолимфы *P. corneus*. Гемоциты представлены двумя популяциями — гранулоцитами и гиалиноцитами (Ottaviani, Franchini, 1988; Прохорова, Атаев, 2010).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для экспериментов отбирались моллюски *Planorbarius corneus*, культивируемые в лаборатории, с диаметром раковины 25 мм. В качестве ксенотрансплантата использовались фрагменты самостоятельно выпавших чувствительных волосков кошек — вибрисс — длиной 1.5 мм и диаметром 160 мкм. Выбор данного трансплантата обусловлен его подходящими размерными и механическими характеристиками. Для эксперимента использовали непигментированные вибриссы. Снаружи волос покрыт кутикулярным слоем толщиной 55 мкм, в центре находится полая сердцевина диаметром 50 мкм. Трансплантат вводился в ткани моллюска с помощью инъекционной иглы (наружный диаметр 450 мкм).

Инъецированные улитки были зафиксированы через сутки в жидкости Буэна. В дальнейшем материал был заключен в парафин. Срезы толщиной 6—8 мкм окрашивались гематоксилином Майера и подкрашивались раствором эозина.

Исследование реакции гемоцитов на вибриссы *in vitro* выполняли в лунках ячеистого стекла во влажной камере в течение 1 ч. Фрагмент волоса диаметром 65 мкм помещали в каплю гемолимфы объемом 40 мкл. Фотографирование осуществляли в режиме фазового контраста (микроскоп Leica DM 5000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение гистологических срезов показало, что через сутки после введения трансплантата вокруг него наблюдается хорошо заметное скопление гемоцитов (рис. 1, *А*, *Б*, см. вкл.). На поверхности волоска располагаются распластанные гемоциты (вероятно, гранулоциты), образуя 1—2 слоя (рис. 1, *Б*, *Г*). Сам трансплантат находится в канале, образованном в ткани моллюска инъекционной иглой (рис. 1, *А*, *В*). В течение суток после инъекции этот канал отчетливо прослеживается на всем протяжении введения иглы. Его стенка также купирована слоями (от 5 до 15) уплощенных гемо-

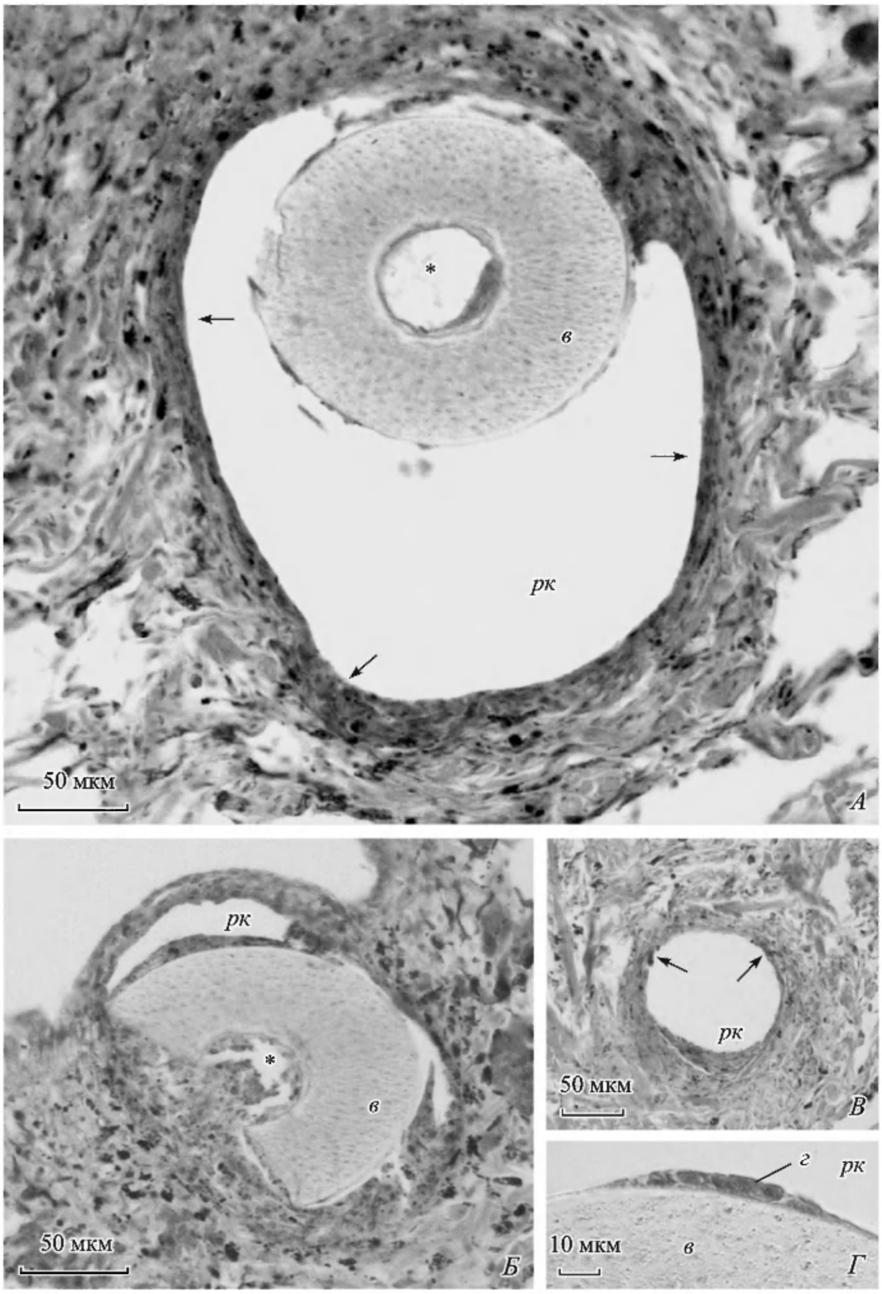

Рис. 1. Гемоцитарная реакция моллюска *Planorbarius corneus* через 1 сут после введения ксеиотрансплантата (вибрисса кошки).

А — срез через середину трансплантата, *Б* — срез через проксимальную часть трансплантата (со стороны подошвы моллюска), *В* — дистальная часть раневого канала, *Г* — распластывание гемоцитов на поверхности вибриссы. *в* — вибрисса, *г* — гемоциты, *рк* — раневой канал, стрелками обозначена гемоцитарная капсула, звездочкой обозначена сердцевина вибриссы.

Fig. 1. Haemocytic reaction of the great ramshorn *Planorbarius corneus* since a day after the insertion of the transplant (cat vibrissa).

цитов (рис. 2, *Б*, см. вкл.). Максимальная толщина стенки капсулы составляет 48 мкм. Таким образом, на срезе отчетливо видны два концентрических скопления гемоцитов: одно непосредственно на поверхности трансплантата, а другое выстилает раневой канал со стороны окружающих тканей моллюска. Между ними остается широкий просвет, в котором наблюдаются лишь отдельные клетки. В то же время ближе к дистальному участку введенного трансплантата со стороны стенки раневого канала образуется скопление гемоцитов, достигающее поверхности волоска и окружающее его несколькими слоями (рис. 2, *А*). Составляющие это скопление клетки характеризуются хорошо заметными псевдоподиями, свидетельствующими об их подвижности. Можно предположить, что в дальнейшем это скопление увеличилось бы в размерах и постепенно заполнило весь просвет раневого канала, надежно инкапсулировав ксенотрансплантат от окружающих тканей.

Интересно проникновение гемоцитов в полость сердцевинной части волоска. Наиболее многочисленны они со стороны входа в полость (рис. 1, *Б*). В основном в этих скоплениях присутствуют гранулоциты, обладающие хорошо заметными псевдоподиями (рис. 2, *В*).

Выше отмечалось, что гемоциты моллюсков *P. corneus* представлены гранулоцитами и гиалиноцитами (рис. 3, *А*, см. вкл.). Во время инкубации участка вибриссы во влажной камере с гемолимфой *in vitro* наблюдается постепенное налипание и распластывание гемоцитов на волосе (рис. 3, *Б*). По морфологии и размерам клетки адгезирующие на поверхности вибриссы напоминают гранулоциты.

В настоящее время большинством авторов в качестве универсальной гемопоэтической структуры пульмонат признается амебоцито-продуцирующий орган (АПО) (Атаев, Прохорова, 2013). Именно за счет пролиферативных процессов в этом органе резко увеличивается количество циркулирующих элементов гемолимфы в ответ на иммунизацию моллюска. Первые признаки активизации АПО могут быть заметны уже через 6 ч после введения в моллюска чужеродного объекта, однако значительный рост числа гемоцитов для большинства пульмонат наблюдается не ранее, чем через сутки после иммунизации (Huffman, Fried, 1996; Ataev, Coustau, 1999, и др.). На максимальный уровень этот показатель вообще выходит на 3—6-е сут (в зависимости от природы чужеродного фактора). Этот же срок указывается как время массовой гибели в резистентных биомфаляриях инкапсулированных партенит *Schistosoma mansoni* и *Echinostoma caproni* (Loker, Bayne, 1982; Ataev, Coustau, 1999).

Вышеприведенные данные обусловили выбор одних суток как срока вскрытия экспериментальных моллюсков. Наблюдаемая в это время клеточная реакция на введение ксенотрансплантата является первичной, в которой в основном задействованы гемоциты из окружающих тканей. При этом они оказываются не только способными определить чужеродный объект, но и изолировать его. Одновременно происходит полное купирование раневого канала.

Вместе с тем дефицит гемоцитов в периферических тканях на начальном этапе не позволяет быстро сформировать очаг воспалительной инфильтрации. Поэтому только после купирования раневой поверхности происходит постепенное заполнение просвета раневого канала гемоцита-

К с. 130

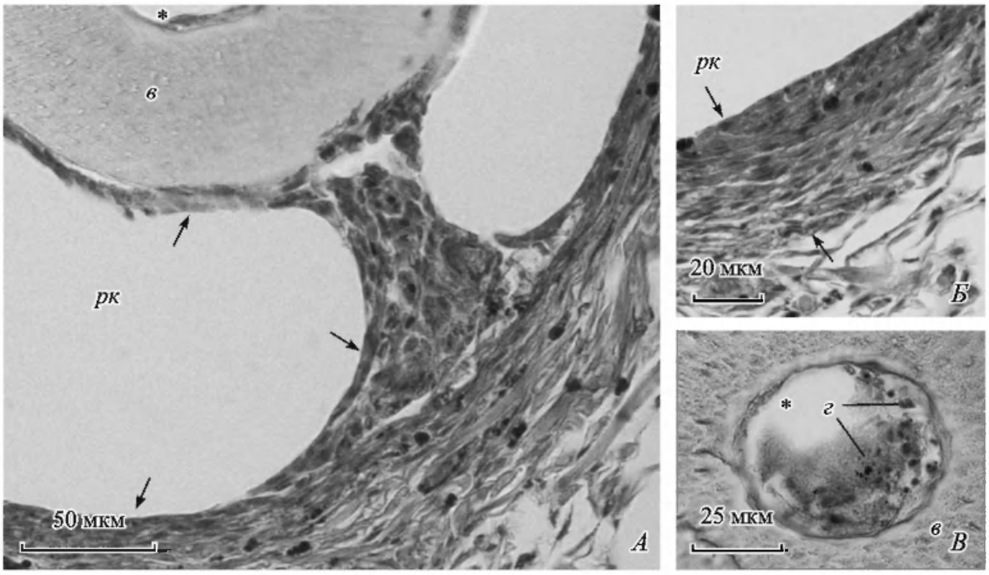

Рис. 2. *А—В*. Заполнение раневого канала и сердцевины ксенотрансплантата (вибрисса) гемоцитами *Planorbarius corneus*. Гистологические срезы ксенотрансплантата (вибрисса кошки).

Fig. 2 (*А—В*). Filling of the wound channel and the core of the xenotransplant (vibrissa) with haemocytes of *Planorbarius corneus.*

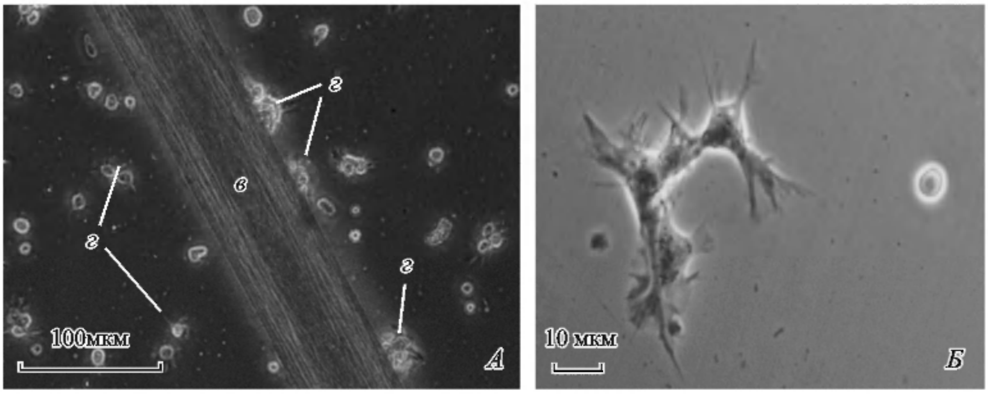

Рис. 3. Гемоциты моллюска *Planorbarius corneus in vitro*.

А — гранулоциты (слева) хорошо распластываются на субстрате, гиалиноцит (справа) не адгезирует на поверхности, *Б* — инкубированнная вибрисса в гемолимфе моллюска *Planorbarius corneus*. Гемоциты адгезируют на поверхности волоса.

Fig. 3 (*А—Б*). Haemocytes of the mollusk *Planorbarius corneus* in vitro.

ми. Вероятно, подобная тканевая реакция предшествует активизации АПО и является неспецифической — аналогичной первичному клеточному ответу на внедрение трематод (Lie, Heyneman, 1976; Атаев, 2000; Атаев, Полевщиков, 2004).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации ГЗК № 6.1278.2014/K.

Список литературы

Атаев Г. Л. 2000. Развитие партенит трематод: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб. 35 с.

Атаев Г. Л., Полевщиков А. В. 2004. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1. Клеточные реакции. Паразитология. 38 (4): 342—351.

Атаев Г. Л., Прохорова Е. Е. 2013. Изменения в амебоцито-продуцирующем органе моллюсков *Biomphalaria glabrata* при заражении трематодами *Echinostoma caproni*. Паразитология. 47 (6): 472—479.

Атаев Г. Л., Прохорова Е. Е. 2010. Защитные реакции моллюсков семейства Planorbidae (Gastropoda, Pulmonata) на трематодную инвазию. Изв. Рос. гос. педагогич. ун-та им. А. И. Герцена. 122: 91—107.

Крюкова Н. А., Дубовский И. М., Гризанова Е. В., Наумкина Е. А., Глупов В. В. 2008. Формирование клеточного иммунного ответа *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при паразитировании *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). В сб. матер. IV Всерос. съезда Паразитол. общ-ва при РАН. Паразитология в XXI в. — проблемы, методы, решения. СПб.: Лема. 2: 99—100.

Ataev G. L., Coustau C. 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. Developmental and Comparative Immunology. 23(3): 187—198.

Huffman J. E., Fried B. 1996. Echinostoma and Echinostomiasis. Advances in Parasitology. 29: 215—269.

Jourdane J., Cheng T. C. 1987. The two-phase recognition process of allografts in a Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata*. Journ. of Invertebrate Patology. 49: 145—158.

Lie K. J., Heyneman D. 1976. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*. Journ. of Parasitol. 62: 51—58.

Loker E. C., Bayne C. J. 1982. In vitro encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. American Journ. of Tropical Medicine and Hygiene. 3: 999—1005.

Ottaviani E., Franchini A. 1988. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). Acta Zoolologica. 69 (3): 157—162.

Ratcliffe N. A., Rowly A. F., Fitzgerald S. W., Rhodes C. P. 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. International Review of Cytology. 97: 183—350.

Sullivan J. T. 1990. Long-term survival of heterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Molluska: Pulmonata). Transactions of the American Microscopical Society. 109: 52—60.

REACTION OF HAEMOCYTES OF THE MOLLUSK PLANORBARIUS CORNEUS TO A XENOTRANSPLANT

E. E. Prokhorova, A. S. Tokmakova, G. L. Ataev

Key words: *Planorbarius corneus*, xenotransplant, haemocytes, incapsulation.

SUMMARY

Tissue reaction of the mollusk *Planorbarius corneus* to the introduction of a transplant (cat vibrissa) was examined. The transplant was introduced into mollusk tissues with the use of an injection needle. After a day, flattened haemocytes were found on the surface of the transplant. The wound channel formed by the needle was arrested by a capsule formed of 5—15 layers of flattened cells. The cavity of the wound channel and the core of the vibrissa were also filled with haemocytes. During incubation of the vibrissa *in vitro*, adhesion and sedimentation of haemocytes on its surface was observed.